

**Központi idegrendszeri fertőzésekkel és hasmenéssel összefüggésbe
hozható enterális RNS vírusok nukleinsav-alapú kimutatása és
epidemiológiai vizsgálata sertés és humán mintákban**

László Zoltán

(Biotechnológus MSc)

Témavezető: Dr. Boros Ákos

PTE KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet



Pécsi Tudományegyetem, OGYDHT Pécs

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola (D95)

Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Reglódi Dóra egyetemi tanár

Doktori program: Bakteriális fertőzések molekuláris pathogenezeise

Programvezető: Dr. Kerényi Mónika, egyetemi docens, Ph.D.

Pécs, 2025.

1. Bevezetés

Sertések számos virális kórokozó (>70 db) gazdaállatai és egyben rezervoárjai is [1], melyek közül számos olyan vírust ismerünk, melyek bizonyos esetben képesek lehetnek embereket is megfertőzni (spillover/gazdaváltás). Ilyen vírusok lehetnek az egyes sertés astrovírusok (*Astroviridae* víruscsalád), illetve a hasmenéssel összefüggésbe hozható sertés noro-, és sapovírusok (*Caliciviridae*). Emellett több olyan sertés vírus is létezik, melyeknek zoonotikus potenciálja nem vizsgált/nem ismert, mint a picornavírusok (*Picornaviridae*) közé tartozó sertés teschovírusok, a sertés sapelovírusok. Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíjhoz kapcsolódó vizsgálataink során két szervrendszert, a központi idegrendszert (KiR-t), és a bélrendszert érintő fertőzésekkel és azok virális hátterével foglalkoztam részletesebben.

Sertések leggyakoribb encephalomyelitist okozó vírusfertőzései közé tartoznak a pozitív, egyszálú RNS-genomú (+ssRNS) picornavírusok közül a sertés sapelo- (Se-SapeV), és teschovírusok (Se-TeV), valamint a szintén RNS-genomú astrovírusok közül a 3-as típusú sertés astrovírus (Se-AsV3) [2], melyek központi szerepet kaptak KiR-t érintő vírusfertőzésekkel kapcsolatos vizsgálatainkban.

A jelenleg két ismert genotípusba (Se-SapeV-1, -2) tartozó **Se-SapeV** törzsek a *Sapelovirus* nemzetség *Sapelovirus anglia* fájába tartoznak. Ezeket a vírusokat sertésekben számos betegséggel, köztük különféle légúti infekciókkal és központi idegrendszeri tünetekkel, pl. bénulással és paraplégiával járó kórképekkel hozták összefüggésbe, ugyanakkor a tünetmentes állatok bélsármintáiból is gyakran kimutathatóak [3]. Kevés hazai adat áll rendelkezésre a Se-SapeV hazai prevalenciájáról, kiváltképp légúti mintákban, illetve ezeknek a vírusoknak a jelenlétét tudomásunk szerint még nem vizsgálták központi idegrendszeri tüneteket mutató betegekből származó humán mintákban sem.

A szintén *Picornaviridae* víruscsaládba, ezen belül a **Teschovirus** nemzetségébe tartozó, RNS genomú sertés teschovírusoknak (Se-TeV) két vírusfaja és közel kétszáz vírustörzse ismert [4]. Egyes Se-TeV típusok különböző klinikai tünetekkel is

összefüggésbe hozhatók sertésekben, például hasmenéssel és légzőszervi betegségekkel, illetve magas mortalitással járó KiR-t érintő megbetegedésekkel [2]. A Se-TeV-okat is általában bélsármintákból lehet közvetlenül kimutatni, bár egyes Se-TeV törzsek légúti mintákban is előfordulnak [2]. A sertés a Se-TeV egyetlen ismert gazdafaja, azonban (vagy ezért) jelenlétét célzottan nem szokták vizsgálni más fajokban, így emberben sem.

A szintén +ssRNS genommal rendelkező **astrovírusok** genetikailag az egyik legváltozékonyabb és legfajgazdagabb csoport az ismert vírusok között [5]. Az érett virionok felszínét főleg az immundomináns VP27, illetve VP25 kapszid-fehérjék alkotják, melyeket specifikus IgG/IgM/IgA-alapú immunválaszok szerológiai vizsgálatai során antigénként alkalmaznak [5]. A vizsgálatainkban fontos szerepet játszó, a sertések súlyos paraplégiáját/paralízisét okozó 3-as típusú sertés astrovírusok (Se-AstV3) a *Mamastrovirus* nemzetségen belül az ember-nyérc-juh (human-mink-ovine / HMO) filogenetikai kládba tartozó MAstV-22-es fajban tartoznak [6].

Vizsgálataink másik csoportja az **emésztőszervi betegségekkel** kapcsolatos volt. A sertések gyakran etiológiailag összetett enterális kórképeiben több vírus is szerepet játszhat, például a *Caliciviridae* víruscsaládba tartozó sapovírusok (*Sapovirus* nemzetség), illetve kisebb mértékben a nemrég felfedezett valovírusok (*Valovirus* nemzetség) és a humánegészségügyi szempontból is fontos norovírusok (*Norovirus* nemzetség), melyek központi szerepet játszott a kutatásainkban, és melyekre a bélsárral történő ürülés és a fekális-orális terjedés, mint fő fertőzési mód alapján sertés enterális calicivírusokként (SECV) hivatkozunk a továbbiakban. A sertések nyála/orális folyadéká viszonylag széles körben használt mintatípus légúti vírusok vizsgálatához, melyet ismereteink szerint enterális vírusok kimutatására még nem használták korábban.

A három nyílt leolvasási keretet (ORF1-3) tartalmazó, +ssRNS genommal rendelkező **Norovírus** nemzetség egyes tagjai sertés és emberi gazdaszervezeteket is képes megfertőzni [7]. A sertés norovírusokat (Se-NoV) elsősorban tünetmentes, illetve enyhe hasmenést mutató egyedek enterális mintáiból mutatták ki, minden életkorban általában alacsony pozitivitási aránnyal. A norovírusok humánegészségügyi

szempontból kiemelt jelentőséggel bírnak, mivel napjainkban az akut gastroenteritis járványok vezető kórokozói [8]. A rendkívüli genetikai változatosság és gyakori rekombináció miatt a norovírusoknál kettős tipizálási rendszert (polimeráz: P-típusok, >60 félé; kapszid: G-típusok, >48 félé) vezettek be [8]. A GII genocsoporton belül a GII.11, GII.18 és GII.19 az úgynevezett domináns „sertés norovírus genotípus”-ok, míg a genetikailag közeli rokon GII.4, GII.3 (melyek sporadikusan kimutathatóak voltak sertés enterális mintákból is) és GII.12 genotípusok a humán szempontból releváns kórokozók [9]. A humán járványokat általában a GII.4 dominálja, ugyanakkor 2014-2017 között a GII.17 és GII.2 is komoly járványkitöréseket okozott. Eddig csupán 13 teljes sertés norovírus kapszid szekvencia és 5 teljes genom ismert, amelyek mind a „sertés norovírus genotípusokhoz” tartoznak [10]. Az enterális vírusoknak tekintett norovírusok közül bizonyos humán törzsek képesek lehetnek nyálmirigyekben szaporodni és nyállal terjedni, de jelenlétüket sertések nyálában/orális folyadékában még nem vizsgálták [11].

A rendkívüli genetikai változatossággal bíró, két ORF-et tartalmazó +ssRNS genomú **sapovírusok** (SaV) sertéseket és embereket is képes megfertőzni. A sapovírusokat a teljes VP1 kapszid szekvenciák alapján 19 genocsoportra (GI-GXIX) és legalább 52 genotípusra osztják, melyek közül a GIII a legjelentősebb sertésekben, míg a GI, GII, GIV, és GV genocsoportok tagjai az emberi fertőzésekre jellemzőek [9,12]. A SaV GIII genocsoport több, számmal el sem látott genotípust (>11) tartalmaz [12]. Az akár járványosan is előforduló tünetmentes és hasmenéses SaV fertőzések nagyon gyakoriak a sertések körében, prevalenciájuk az elválasztás utáni időszakban a legmagasabb [9]. A sapovírusokat enterális vírusoknak tekintik, azonban nem áll rendelkezésünkre adat jelenlétükről egyéb testfolyadékokban, pl. nyálban. Bár humán (>3600 db szekvencia) és sertés sapovírusok (>700) is nagy számban elérhetőek, csak kevés hazai szekvencia ismert, melyek mindegyike a mi kutatócsoportunk korábbi eredményei [12].

A *Valovirus* nemzetség két ORF-et tartalmazó +ssRNS genomú vírusait először 2009-ben írták le tünetmentes hízó sertések enterális mintáiból [13]. Azóta sertés

valovírusok (Se-VaV) több kontinensen is kimutathatóak voltak 4 hónapnál idősebb sertések bélsármintáiból [14,15]. A valovírusok előfordulásáról, patogenezisééről és genomi változatosságáról kevés adat áll rendelkezésünkre. A Se-VaV esetében csak egy genocsoport és egy genotípus (GI.1) ismert [15]. Valovírusokat Magyarországon még nem mutatták ki, humán törzsei/típusai egyáltalán nem ismertek, jelenlétüket nyálban/orális folyadékban még nem vizsgálták.

Az vizsgálatainkba bevont vírusok kimutatására alkalmas multiplex RT-qPCR-alapú tesztek nem ismertek. Az RT-qPCR módszerrel azonosított calicivírusok pontos tipizálásához elengedhetetlen legalább a kapszid-kódoló genom régió szekvenciájának meghatározása, melyhez leggyakrabban Sanger-szekvenálást alkalmaznak, ami az „új generációs szekvenálási” (NGS) módszerekkel (pl.: Illumina) ellentétben nem alkalmas több vírusgenom egyidejű kimutatására.

2. Célkitűzések

A Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíjhoz kapcsolódó kutatásaink során két betegségtípusban, az encephalomyelitisben, illetve a gastroenteritisben előforduló sertés vírusok (Se-TeV/Se-SapeV /Se-AstV3 és Se-SaV-GIII/Se-NoV-GII/Se-VaV) kimutatására alkalmas, hidrolízis-próbákon alapuló egylépéses multiplex RT-qPCR tesztek (sertés encephalomyelitis-panel és sertés enterális calicivírus-panel) állítottunk össze. A kifejlesztett tesztekkel epidemiológiai vizsgálatokat végeztünk különböző sertés és humán mintákon.

A sertés encephalomyelitis-panellel végett vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy:

- A kiválasztott vírusok kimutathatóak-e, és ha igen, akkor mekkora prevalenciával hazai sertések enterális és extra-intestinális mintáiban (szövet, illetve orrtampon-mintákban)?

- o Az Se-AstV3 pozitív tünetmentes, illetve encephalomyelitises állatok rendelkeznek-e Se-AstV3 elleni IgG antitestválasszal?

- A Se-AstV3 encephalomyelitises sertések különböző szerv/szövetmintáiban kimutatható-e egyéb vizsgált vírus?

- A kiválasztott vírusok kimutathatóak-e archivált humán encephalitiszes esetekből származó mintákban (zoonózis vizsgálata)?

A sertés **enterális calicivírus-panellel** és hozzá kapcsolódó 3'RACE-PCR és NGS technikákkal végzett vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy:

- A kiválasztott calicivírusok kimutathatóak-e, és ha igen, akkor mekkora prevalenciával a különböző korú és egészségi állapotú sertések enterális és nyálmintáiban?

- Milyen genotípusokba és szubtípusokba tartozó calicivírusok mutathatók ki?

- Mekkora az intra-, és inter-genotípusok társ-fertőzéseinek aránya?

- A kiválasztott calicivírusok kimutathatóak-e archivált humán gastroenteritiszes esetekből származó mintákban (zoonózis vizsgálata)?

3. Anyag és módszerek

Oligonukleotid primerek és hidrolízis próbák tervezése

A sertés encephalomyelitis és sertés enterális calicivírus triplex RT-qPCR panelekhez a GenBankban elérhető célvírusok (Se-TeV/Se-SapeV/Se-AstV3 és Se-SaV-GIII/Se-NoV-GII/Se-VaV) szekvenciáiból generált illesztések alapján vírus specifikus primereket és három különböző fluorofórral (6-FAM, SUN és CY-5) jelölt hidrolízis próbákat manuálisan terveztünk meg a legkonzervatívabb genom régiókra.

Virális RNS standardok in vitro előállítása

Az RT-qPCR reakciók reakciókörülményeinek beállításához és a reakciók hatékonyságának ellenőrzéséhez *in vitro* előállított (plazmid ligálás, transzformálás, plazmid-izolálás, linearizálás, T7 RNS polimeráz-alapú RNS szintézis, Qubit 4 fluoriméteres mérés) 400-600 nt hosszú virális RNS standardokat használtunk.

RT-qPCR reakciókörülmények és adatelemzés

Az encephalomyelitis-panellel történő vizsgálatainkhoz a LightCycler® One-step Multiplex RNA Virus Master Mix-et (Roche, Svájc), míg az enterális calicivírus panel esetében a Luna® Universal Probe qPCR Master Mix-et (New England Biolabs, Ipswich, USA) alkalmaztuk a gyártó ajánlásai alapján. Az RT-qPCR reakciókat CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA) készüléken futtattuk le. Az adatelemzés Bio-Rad CFX Maestro 2.2 ver. 5.2.008.0222 (Bio-Rad Laboratories, USA) szoftver segítségével történt.

Az RT-qPCR panelek analitikai teljesítményének vizsgálata

Mindkét panel esetében az egyszeres (singleplex) és háromszoros (triplex) RT-qPCR vizsgálatok analitikai szenzitivitását, specificitását, alsó kimutatási határértékeit, egyes vizsgálatokon belüli és vizsgálatok közötti reprodukálhatóságot a virális RNS standardok 10-szeres sorozathígításának segítségével határoztuk meg.

A vizsgálatokba bevont minták

Az encephalomyelitis-panellel végzett vizsgálatokhoz tünetmentes (92 db), vagy paraplegiás (28 db) állatoktól származó széklet/rektális tampon minták (100 db), szövetszövetminták (62 db), valamint 21-25 napos tünetmentes állatoktól levett orrtampon mintát (473 db) is használtunk. Humán minták közül összesen 74 db ismeretlen eredetű agyvelőgyulladásos esetből származó archivált vér- és liquorminta-párt is vizsgáltunk. Az enterális calicivírus-panellel végzett vizsgálatokhoz összesen 198 db archivált enterális (135 db hasmenéses és 63 db tünetmentes) és 228 db orális folyadék/nyál-mintát használtunk, melyeket négy korcsoportba soroltuk. Egy retrospektív követéses vizsgálat keretében összesen 336 db rektális törlés-mintát is vizsgáltunk. Humán minták közül összesen 312 db archivált székletmintát is vizsgáltunk, melyből 75 db kórházi ellátást igénylő, 10 év alatti hasmenéses gyermektől, míg a fennmaradó 237db pedig 1 év alatti, különböző súlyosságú (kórházi vagy otthoni ápolású egyaránt) hasmenéses gyermektől származott.

A minták előkészítése és teljes RNS kivonása

A vizsgált enterális és a szövetmintákból a totál RNS kivonást TRI® Reagenssel (MRC, Cincinnati, OH, USA) míg az orális folyadékmintákból QIAamp cadon Pathogen Mini kit-el QIAcube (Qiagen, Germany) nukleinsav-izoláló automatával a gyártó utasításai szerint.

Reverz transzkripció, polimeráz láncreakció és Sanger szekvenálás

A calicivírusok 3'RACE- semi nested (sn)PCR reakcióihoz a SECV RT-qPCR panel forward és próba szekvenciáiból készült forward primereket és a GoTaq® Long PCR Master Mix-et (Promega, USA) használtuk. A PCR termékek Sanger-szekvenálását a BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo-Fisher, USA) segítségével végeztük a gyártói protokoll alapján. A kapott termékeket egy ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, Tokyo, Japan) automata szekvenáló készüléken futtattuk le.

Újgenerációs szekvenálási és adatelemzési folyamat

A calicivírusok 3'RACE-snPCR második PCR körének termékeiből a könyvtárt a NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit-el (NEB, USA) készítettük el és NovaSeq 6000/X Plus (Illumina, USA) platformon futtattuk le 1, 10, illetve 50 millió leolvasási mélységgel. A szekvencia-adatok elemzéséhez, konszenzus-szekvenciák összeszereléséhez Geneious Prime szoftvert használtuk.

Filogenetikai és szekvencia analízis

A szekvenciák illesztését Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE), vagy a CLUSTAL 2.1 alkalmazásokkal végeztük el. A filogenetikai fák készítéséhez a MEGA ver. 11.0 szoftvert használtuk. A VP1 nukleotid szekvenciákból a hierarchikus klaszter-elemzést R/RStudio környezetben írt scripttel végeztük.

Se-AstV3 VP27 antigénre épülő western blot szerológiai teszt

A rekombináns Se-AstV3 VP27 virális kapszid fehérje termeléséhez a Se-AstV3 VP27 kapszid protein kódoló genom-szakaszt tartalmazó és negatív kontrollként „üres” pLATE 5.2 expressziós plazmidot (Thermo-Fisher, USA) és kompetens *Escherichia coli*

BL21-Rosetta 2 sejteket használtunk. A termelt szolubilis 6xHis-jelölt rekombináns fehérjét „immobilized metal affinity chromatography” (IMAC) módszerrel Ni-NTA oszlopon tisztítottuk. A tisztított VP27 fehérje és a negatív kontroll izolátumait SDS-PAGE-el elválasztottuk, ezután nitrocellulóz membránra blottoltunk. Blokkolás után a membránokon 1:100 hígított sertés savó mintákat inkubáltuk, a lekötődött antitesteket anti-sertés IgG-HRPO (Rockland Immunochemicals, USA) másodlagos antitesttel jelöltük meg és chemiluminescens technikával vizualizáltuk. A kísérlet GMO engedélyszáma: BGMF/178-10/2020.

4. Eredmények

4.1. A sertés encephalomyelitis RT-qPCR panellel végzett vizsgálataink eredményei

A Se-TeV, Se-SapeV és Se-AstV3 vírusokat kimutató sertés encephalomyelitis RT-qPCR panel reakcióinak analitikai érzékenységét először külön-külön egyszeres (singleplex) reakciókban vizsgáltuk az *in vitro* előállított virális standardok hígítási sorát használva, majd a reakciókat háromszoros (triplex RT-qPCR/tRT-qPCR) vizsgálatokban is elvégeztünk. Az alsó kimutathatósági határt 100 kópia közelében határoztuk meg. A Cq értékek varianciája és a CV% (coefficients of variation) az adott kísérleten belül 0,03–4,62%, míg különböző kísérletek között 0,86–3,29% értékeket mutatott.

A hagyományos szűrő RT-PCR és a tRT-qPCR reakciók összehasonlító vizsgálataiban a két kísérlet típus eredményei közötti egyezés 90,85%-os volt a Se-SapeV esetében, míg 91,55% volt a Se-TeV és 93,66% volt a Se-AstV3 esetében. A különböző eredményt mutató mintákból származó (vagy tRT-qPCR+/RT-PCR–, vagy tRT-qPCR –/RT-PCR +) PCR termékeket megszekvenáltuk, hogy kizárjuk az esetleges álpozitív mintákat. Összesen 3db tRT-qPCR, illetve 11db hagyományos RT-PCR álpozitív (nem virális vagy nem szekvenálható) mintát azonosítottunk.

A Se-SapeV, Se-TeV és Se-AstV3 jelenlétét 28 különböző hazai telepekről származó, összesen 473 db 21-25 napos tünetmentes sertésektől vett orrtampon mintákban is vizsgáltuk. A Se-SapeV (7,8%) és a Se-TeV (9,9%) pozitivitásaival összehasonlítva a Se-AstV3 pozitív orrtampon-minták aránya (17,8%) jóval

magasabbnak bizonyult. A kettős fertőzéseket 1,3%-ban (6db Se-SapeV/Se-AstV3), 1,5%-ban (7db Se-SapeV/Se-TeV) és 2,8%-ban (13db Se-TeV/Se-AstV3) azonosítottuk, emellett hármás fertőzést csupán az esetek 0,4%-ban tudtuk azonosítani. Mindhárom vizsgált vírus viszonylag alacsony előfordulással (<30%, többnyire 1–3 pozitív minta/telep) volt jelen a legtöbb telepen (66.7–75%). Az ismeretlen etiológiájú paraplégias sertésektől vett központi idegrendszeri minták egyike sem mutatott RT-qPCR pozitivitást.

A rekombináns Se-AstV3 VP27 kapszid fehérjével végzett **western blot-alapú szerológiai vizsgálattal** a tünetmentes malacokban kimutatható volt az anti-Se-AstV3 VP27 IgG antitest, míg a Se-AstV3 encephalitiszes állatoktól nem. Az összesen 74 db ismeretlen eredetű agyvelőgyulladásos esetekből származó archivált humán minták tRT-qPCR vizsgálatai mindegyike negatív eredménnyel zárult.

4.2. A sertés enterális calicivírus (SECV) RT-qPCR panellel végzett vizsgálataink eredményei

A Se-SaV-GIII/Se-NoV-GII/Se-VaV vírusokat kimutató SECV RT-qPCR panel reakcióinak analitikai érzékenységét *in vitro* előállított virális RNS standardok sorozathígításaival (1E8-1E1 kópia/reakció) mind egyszeres reakciókban, mind háromszoros formában is teszteltük azonos reakciókörülmények között. Az egyszeres és háromszoros RT-qPCR tesztekben az alsó kimutatási határ 100 kópia/reakció volt (kivéve Se-SaV esetében 1000 kópia/reakció), míg a CV% az adott kísérleten belül 0,05–2,75%, míg különböző kísérletek között 1,17–5,12% értékeket mutatott.

A Se-NoV, Se-SaV és Se-VaV tRT-qPCR-alapú epidemiológiai vizsgálataink során az enterális mintákban a Se-SaV-t 26,26%-ban, a Se-NoV-t 2,53%-ban, míg a Se-VaV-t 1,52%-ban mutattuk ki, míg a nyálminták esetében a Se-NoV mutatta a legmagasabb prevalenciát (7,46%), míg a Se-SaV 4,39%-ban, míg a Se-VaV 0,88%-ban volt kimutatható.

A különböző korcsoportokba tartozó állatok vizsgálata során a Se-SaV volt a leggyakrabban kimutatható vírus az elválasztás korú malacokban az enterális és nyálmintákban egyaránt (38,58% és 6,54%). Érdekes módon míg minden Se-NoV

pozitív enterális minta az elválasztás korú malacoktól származott, addig a Se-NoV pozitív nyálminták többsége (n=16/17) idősebb, hízó sertésektől lett gyűjtve. Az összesen 7 db Se-VaV-t elválasztás korú malactól származó enterális mintában (5 db), valamint egy hízó és egy elválasztás korú sertés nyálmintáiban találtuk. A hasmenéses egyedekből származó enterális minták Se-SaV pozitivitása (52,38%) a tünetmentes állatokhoz viszonyítva (14,07%) szignifikánsnak bizonyult (p-érték <0,001). Kettős fertőzéseket összesen három enterális mintában azonosítottuk (2db Se-SaV–Se-NoV és egy Se-SaV–Se-VaV fertőzés) két szopós és egy elválasztás korú sertés esetében.

A háromszoros SECV RT-qPCR tesztünkkel egy **retrospektív követéses vizsgálat** során 42 tünetmentes sertéstől származó, összesen 336 db rektális tamponmintát is vizsgáltuk egy újonnan létrehozott istállóban, ahol a sertések együtt voltak elhelyezve, és egyedileg lettek mintázva egy, illetve kéthetente, összesen nyolc alkalommal. Összesen 28/42 állat (66,67%) volt Se-SaV pozitív a vizsgálati időszak alatt, ugyanakkor Se-NoV és Se-VaV nem volt kimutatható. A pozitív minták többsége (24/28; 85,71%) 70 napos, míg a fennmaradó négy pozitív 77 napos korú állatokból származott. Nem voltak olyan állatok, amelyek mindkét mintavételi időpontban pozitívak lettek volna.

Az háromszoros SECV RT-qPCR segítségével összesen 312 db archivált **humán székletmintát** is vizsgáltunk, melyekből sapovírust és valovírust sem sikerült kimutatni, ellenben összesen 23 minta norovírus pozitivitást mutatott.

A humán és sertés enterális, valamint sertés nyálmintákból tRT-qPCR módszerrel azonosított **calicivírusok tipizálásához, NGS-alapú genotípus variációjának vizsgálatához** a pozitív minták közül összesen 27db Se-SaV, 13db Se-NoV és 4db Se-VaV terméket, míg humán mintákból 14 db NoV 3RACE sn-PCR terméket választottunk ki NGS szekvenáláshoz (NovaSeq platform, Illumina). Referencia-alapú térképezés és *de novo* összeszerelés-alapú bioinformatikai elemzéssel a kapott NGS adatokból összesen 77 db calicivírus konszenzus szekvenciát tudtunk meghatározni. Sapovírus szekvenciák esetében a vizsgált 3'RACE-snPCR termék fele legalább kétféle (maximum 5-féle) konszenzus szekvenciát/variánst tartalmazott. Sertésekből

azonosított norovírusok esetében a legtöbb 3'RACE-snPcR termékből csak egy konszenzus szekvenciát tudtunk összeszerelni, míg két minta 2-2 különböző NoV szekvencia variánst is tartalmazott. A valovírusok esetében minden 3'RACE-snPcR termékből csak egyetlen konszenzus szekvenciát tudtunk összeszerelni.

Összesen 8db olyan 3'RACE-snPcR terméket, amelyeket NGS szekvenálással vizsgáltunk, és amelyek több konszenzus szekvenciát tartalmaztak Sanger-módszerrel is megszekvenáltunk, amely csak a leggyakoribb (legnagyobb lefedettséggel rendelkező) variánsokat mutatta ki.

Az azonosított **SaV VP1 szekvenciák** mindegyike GIII genocsoport szekvenciáival mutat legközelebbi rokonságot, kivéve egyet, amely a GVII törzsekkel alkot közös leszármazási vonalat. A GIII törzsek hat különböző filogenetikai klaszterbe (potenciális genotípusok) helyezkedtek el.

A vizsgálataink során azonosított 13 db **sertés NoV VP1** szekvenciák közül a filogenetikai elemzés alapján 6 a sertés norovírus GII.18 klaszterben, míg a fennmaradó 7 a sertés norovírus GII.11 klaszterben helyezkedett el. A GII.11 klaszterben jól megfigyelhető volt két fő leszármazási vonal, melyet a szekvenciák a klaszter-analízisének eredménye is alátámasztott.

Filogenetikai vizsgálatainkban az azonosított 16 **humán NoV VP1** szekvencia közül 9 a GII.4 genotípusú humán norovírusokkal csoportosult együtt, míg a többi szekvencia más klaszterekben (GII.3, GII.6, GII.17) helyezkedett el. A kórházi ellátást igénylő esetekből származó NoV törzsekből 8 db GII.4, 2 db GII.3 és 2 db GII.6 volt, köztük két esetben GII.3/GII.4 társ-fertőzést is azonosítottunk.

A vizsgálataink során azonosított (3 db) és az ismert (10 db) **sertés VaV VP1** szekvenciák filogenetikai elemzése két külön leszármazási vonal jelenlétét mutatta, ahol az enterális illetve nyálmintából származó hazai VaV törzsek eltérő leszármazási vonalhoz tartoztak.

5. Megbeszélés

5.1. A sertés encephalomyelitis RT-qPCR panellel végzett vizsgálataink eredményeinek megbeszélése

Vizsgálataink első felében egy új, hidrolízis próba-alapú encephalomyelitis RT-qPCR panelt állítottunk össze, amely képes egyidejűleg szelektíven és viszonylag magas érzékenységgel kimutatni az összes ismert sertés tescho- (Se-TeV) és sapelovírust (Se-SapeV), valamint 3-as típusú sertés astrovírusokat (Se-AstV3). Az encephalomyelitis tRT-qPCR panellel *in vitro* előállított RNS standardokon végzett analitikai érzékenységi és specificitás-vizsgálataink a teszt optimális hatásfokát és specificitását mutatták. A tRT-qPCR teszt diagnosztikai érzékenységét összehasonlítottuk a korábban használt RT-PCR-alapú szűrővizsgálatokkal archivált RNS mintákon, melynek alapján a tRT-qPCR tesztheink általánosan magasabb megbízhatóságát tapasztaltuk. A diagnosztikai hatékonyság felmérése után epidemiológiai vizsgálatokat is végeztünk több mintatípusban.

A korábban Se-AstV3 fertőzött paraplégias sertések mintái közül bélmintában is sikerült kimutatni a Se-AstV3-t, ami az akut paraplégia idején a vírus, alacsony szintű székletürítésének eddig nem ismert lehetőségére utal. A paraplégias sertések központi idegrendszeren kívüli belső szervei a Se-AstV3 mellett Se-TeV és Se-SapeV pozitívak is voltak, ami a Se-AstV3 neuroinfekció mellett egy disszeminált Se-AstV3, Se-TeV és Se-SapeV hármas társ-fertőzést jeleztek. A legalább hármas társfertőzés hozzájárulhatott a megfigyelt betegség súlyosságáért, és az állatok csökkent immunállapotára is utalnak, amit az is alátámaszthatja, hogy a Se-AstV3 paraplégias sertésekből nem sikerült Se-AstV3 VP27 elleni IgG antitesteket kimutatni az általunk használt western blot-alapú szerológiai tesztünkkel.

A három vírus közül a Se-AstV3 volt a legelterjedtebb mind az orrtampon-minták, mind pedig a vizsgált telepek szintjén, ezt követte a Se-TeV és a Se-SapeV, amelyeket sokkal alacsonyabb prevalenciával detektáltuk. Korábbi orrtampon-prevalencia adatok csak a Se-AstV3-ról állnak rendelkezésre, ahol a legmagasabb kimutatási arányt (30% pozitivitás) a 3 hetes állatokban találták. Eredményeink azt mutatják, hogy mindhárom neurotróp vírus, különösen a Se-AstV3, széleskörűen elterjedt és endemikusan jelen van a hazai nagy termelésű, ipari típusú sertéstelepek többségében. Az AstV-ok neurotropizmusának pontos háttere még nem ismert [5], ugyanakkor valószínűleg a

megfelelő fejlettségű immunrendszerrel rendelkező állatokban nem alakul ki disszeminált fertőzés és neuroinfekció [16], amire a tünetmentes sertésekből vett mintákon végzett western-blot szerológiai vizsgálatunkkal kimutatott anti-Se-AstV3 VP27 IgG antitestek jelenléte is utal. A tRT-qPCR tesztünkkel nem sikerült kimutatnunk egyik vizsgált vírust sem a vizsgált archivált humán vér- és liquor-mintákból, ami arra utalhat, hogy ezek a sertés-eredetű vírusok, vagy nem képesek humán megbetegedéseket okozni, vagy nem olyan elterjedtek, hogy ilyen kisszámú vizsgált mintából kimutathatóak legyenek.

5.2. A sertés enterális calicivírus RT-qPCR panellel végzett vizsgálataink eredményeinek megbeszélése

A második kutatási projektünkben egy optimális érzékenységgű és hatásfokú triplex RT-qPCR-alapú tesztet, ehhez kapcsolódó 3'RACE semi-nested-PCR-alapú teljes-kapszid amplifikációs protokollt, és az erre épülő NGS-alapú vírus-variáns azonosítási folyamatot állítottunk össze, amely alkalmas a leggyakoribb sertés enterális calicivírusok/SECV (sertés sapovírus GIII, norovírus GII és valovírus GI) érzékeny/specifikus és egyidejű kimutatására, valamint a vírusok/variánsok kapszid alapú tipizálására. A folyamatot egy kisebb mintaszámú epidemiológiai vizsgálatban teszteltük, amelyhez archivált sertés enterális és orális folyadék mintákat, illetve humán gastroenteritises-esetekből származó archivált székletmintákat használtunk.

A SECV RT-qPCR tesztünkkel archivált enterális mintákból kimutatott leggyakoribb vírus mind az állatok, mind a telepek szintjén a Se-SaV volt, amit a Se-NoV követett, míg a Se-VaV-ot először tudtuk kimutatni Magyarországon két földrajzilag távoli telepen. A három vírus esetében a legmagasabb pozitivitást a frissen választott malacok enterális mintái között találtuk. A Se-SaV esetében az eredmények összhangban van az irodalommal [17], míg a Se-NoV és Se-VaV esetében a hiányos epidemiológiai adatok miatt az irodalmi életkori prevalencia adatok nem megbízhatóak. A három vizsgált vírus közül csak a Se-SaV volt kimutatható szignifikánsabban magasabb prevalenciával hasmenéses mintákban (52,38% / 14,07%), ami bizonyos

esetekben egyes Se-SaV törzsek enteropatogén szerepét támasztja alá [17]. Az egyedi fertőzések mellett kis számú SaV-NoV (2 db) és SaV-VaV (1 db) egyidejű kettős fertőzést is azonosítottunk, melyek közül a sertésekben észlelt SaV-VaV kettős fertőzés új eredménynek számít.

Egy természetes úton lezajlott, tünetmentes Se-SaV járványt is azonosítottunk egy újonnan létrehozott sertésistállóban egy retrospektív követéses vizsgálatban, ahol a vírus bélsár útján történő ürítése kevesebb mint 2 hétig tartott.

Először sikerült mindhárom vírus jelenlétét (Se-NoV dominanciával) kimutatni sertések orális folyadék/nyálmintáiból. Mindez arra utal, hogy a vizsgált sertés enterális calicivírusok képesek lehetnek sertésekben eddig nem ismert módon, nyál útján is terjedni. Eredményeink azt mutatják, hogy az nyálminták könnyen gyűjthető és költséghatékony alternatívák lehetnek nemcsak légúti fertőzések, hanem enterális (calici)vírusok vizsgálatához.

A calicivírusok tipizálásához és genotípus variációjának vizsgálatához az RT-qPCR tesztlejcekben használt primerek és próbák segítségével 3'RACE-snpPCR módszerrel ≈ 2100 - 2500 bp hosszú teljes kapszidok kódoló 3' genom régiókat amplifikáltunk, majd szekvenciákat NGS módszerrel (NovaSeq, Illumina) határoztuk meg.

Az NGS leolvasásokból a referencia térképezés-alapú, és *de novo* összeszerelés-alapú megközelítésekkel összesen 77 db calicivírus konszenzus szekvenciát (45 db Se-SaV, 13 db Se-NoV és 3 db Se-VaV, 16 humán NoV) azonosítottunk, beleértve több (maximum ötszörös) társ-fertőzésben lévő variánst is. Társfertőzéses esetekről számoltak már be korábban több hazai és külföldi sertésistállóról, bár ott kevésbé magas genotípus-változatosságot találtak [17].

A több variánst tartalmazó 3'RACE-snpPCR termékek Sanger szekvenálása azt mutatta, hogy az NGS-el kimutatható variánsok közül csak a legdominánsabb jelenik meg a Sanger elektroferogrammon. Ezért a calicivírusok epidemiológiai vizsgálataiban az NGS alkalmazása határozottan javasolt mind sertés mind humán vizsgálatokban.

A **sapovírusok** filogenetikai elemzésének eredményei és az elfogadott genotípus elkülönítési kritériumai alapján [18] az összes azonosított Se-SaV variáns 7 különböző SaV genotípushoz (6 db GIII és 1 db GVII) tartozik. Ezek az azonosított SaV genotípusok általánosan elterjedtek a vizsgált hazai sertés telepeken, melyek közül több SaV variáns/genotípus párhuzamosan cirkulált. A vizsgált SaV 3'RACE-snPCR termékek több mint fele legalább kettő (akár öt) filogenetikailag egymástól jól elkülönülő Se-SaV variánst tartalmazott, ami a párhuzamos fertőzések magas szintjére, és a keringő SaV törzsek jelentős genetikai változatosságára utalnak a vizsgált választott sertés populációkban.

Mind a 13 **Se-NoV** konszenzus szekvencia nyálmintából származott, melyek mindegyike a „sertés norovírus genotípusok” csoportjába azon belül GII.11 és GII.18 genotípusokba tartoznak. A talált genotípusok eloszlása/előfordulása összevág az irodalmi adatokkal [19]. Továbbá több olyan telepet is vizsgáltunk, ahol mindkét Se-NoV genotípus kimutatható volt, ami ezeknek a típusoknak az együttes cirkulációját jelezheti az adott sertés populációkban. A vizsgálataink kezdetekor mindössze 13 db teljes hosszúságú Se-NoV VP1 kapszid szekvencia volt elérhető, aminek száma a vizsgálataink eredményeként megduplázódott.

A Se-NoV GII.11 törzseknek két új, jól elkülönülő al-leszármazási vonalát azonosítottuk, ahol az összes hazai nyálmintából származó GII.11 törzsek együttesen egy külön al-leszármazási vonalat alkotnak. A GII.11 törzsek al-leszármazási vonalakba különülése a domináns GII.11 NoV altípusainak/variánsainak, genotípuson belüli eltérő evolúciós mintázatra utalhat, hasonlóan a humán norovírusok domináns GII.4 típusában találtakhoz. A nyálmintából azonosított NoV törzsek filogenetikailag elkülönültek a korábban talált enterális törzsektől, ami felvetheti, hogy a Se-NoV-ok különböző szöveti tropizmussal rendelkezhetnek.

A vizsgálataink során meghatározott hazai és szlovákiai **Se-VaV törzsek** két, korábban nem azonosított leszármazási vonalakat alkotnak, amelyeket a klaszter elemzés is két csoportra különített el. Idáig mindössze 12 db teljes hosszúságú Se-VaV kapszidot határoztak meg, melyek közül csupán egyetlen származik Európából [14].

Mindhárom vizsgálatunk során meghatározott Se-VaV szekvencia filogenetikailag távol állt az olasz törzstől, ami az e régió sertéspopulációiban keringő Se-VaV-ok ismeretlen mélységű genetikai diverzitására utal.

Humán mintákon végzett vizsgálatunkban csak NoV pozitív mintákat találtunk. A kórházi ellátást igénylő 10 év alatti gyermekektől származó mintákban mért 12%-os, és a különböző súlyosságú (kórházi vagy otthoni ápolású egyaránt) 1 év alatti betegektől származó székletmintában talált 5,9%-os norovírus prevalencia adatok alacsonyabbak a nemzetközi irodalomban közölt értékeknél. Ennek oka többek közt lehet a vizsgált mintáink hosszútávú tárolásából adódó nukleinsav-bomlás, illetve, hogy a tesztünket eredetileg sertés calicivírus szekvenciákra terveztük, és nem vettük figyelembe az összes ismert humán calicivírus szekvenciát.

Az NGS adatokból összeszerelt 16 db humán NoV konszenzus szekvenciák mindegyike a GII genocsoportba tartoztak, de a sertés norovírus GII típusokkal nem álltak közeli rokonságban. A leggyakoribb GII típus a domináns GII.4 volt (9/16, 56,3%), melyek az adott időszakra jellemző domináns pandémiás GII.4 variánsokkal (2011-es mintákból New Orleans-2009, míg a 2015/16-os mintákból Sydney-2012) mutattak legközelebbi rokonságot [20]. Emellett GII.3, GII.6 és GII.17 pandémiás törzseket is sikerült kimutatnunk [20. Kórházi kezelést igénylő, súlyosabb esetekben szintén GII.4 dominanciát találtunk (8/10, 80%), hasonlóan korábbi vizsgálatok eredményeihez [20,21]. A maradék két, kórházi kezelést igénylő akut gastroenteritises eset mindegyike NoV GII.6 fertőzéshez köthető, melyet leírtak már hospitalizációt igénylő esetekből. Összesen két olyan kórházi kezelést igénylő esetből származó mintát találtunk (2/14, 14,3%), amelyben egyszerre két, különböző GII genotípusba (GII.4-GII.3 társ-fertőzés) tartozó NoV volt kimutatható. Genocsoporton belüli társfertőzések jelenlétét humán esetekben is csak ritkán vizsgáltak, így azok előfordulási gyakorisága sem ismert, emellett arról sincs információnk, hogy az egyszerre többfelé genotípusú NoV infekció súlyosabb, esetleg kórházi kezelést igénylő tünetekkel jár-e együtt.

Irodalomjegyzék

1. Zhang, J., Yoon, K. J., & Zimmerman, J. J. (2019). Overview of viruses. Diseases of swine, 425-437.
2. Alexandersen, S., Knowles, N. J., Belsham, G. J., Dekker, A., Nfon, C., Zhang, Z., & Koenen, F. (2019). Picornaviruses. *Diseases of swine*, 641-684.
3. Arruda, P. H., Arruda, B. L., Schwartz, K. J., Vannucci, F., Resende, T., Rovira, A., Sundberg, P., Nietfeld, J., & Hause, B. M. (2017). Detection of a novel sapelovirus in central nervous tissue of pigs with polioencephalomyelitis in the USA. *Transboundary and emerging diseases*, 64(2), 311-315.
4. Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A. M. Q., Knowles, N. J. et al. Ictv Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *The Journal of general virology*, 98(10), 2421-2422.
5. Reuter, G., Pankovics, P., & Boros, Á. (2018). Nonsuppurative (Aseptic) Meningoencephalomyelitis Associated with Neurovirulent Astrovirus Infections in Humans and Animals. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00040-18.
6. Boujon, C. L., Koch, M. C., & Seuberlich, T. (2017). The expanding field of mammalian astroviruses: opportunities and challenges in clinical virology. *Advances in virus research*, 99, 109-137.
7. Desselberger U. (2019). *Caliciviridae* Other Than Noroviruses. *Viruses*, 11(3), 286.
8. Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G. I., Chan, M. C., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P. A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M. P. G., & Vinjé, J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *The Journal of general virology*, 100(10), 1393-1406.
9. Davidson, I., Stamelou, E., Giantsis, I. A., Papageorgiou, K. V., Petridou, E., & Kritas, S. K. (2022). The Complexity of Swine Caliciviruses. A Mini Review on Genomic Diversity, Infection Diagnostics, World Prevalence and Pathogenicity. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(4), 413.
10. Cavicchio, L., Laconi, A., Piccirillo, A., & Beato, M. S. (2022). Swine Norovirus: Past, Present, and Future. *Viruses*, 14(3), 537.
11. Lucero, Y., Matson, D. O., Ashkenazi, S., George, S., & O'Ryan, M. (2021). Norovirus: Facts and Reflections from Past, Present, and Future. *Viruses*, 13(12), 2399.
12. Reuter, G., Zimsek-Mijovski, J., Poljsak-Prijatelj, M., Di Bartolo, I., Ruggeri, F. M. et al. (2010). Incidence, diversity, and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe. *Journal of clinical microbiology*, 48(2), 363-368.
13. L'Homme, Y., Sansregret, R., Plante-Fortier, E., Lamontagne, A. M., Ouardani, M., Lacroix, G., & Simard, C. (2009). Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus genes*, 39(1), 66-75.
14. Di Martino, B., Martella, V., Di Profio, F., Ceci, C., & Marsilio, F. (2011). Detection of St-Valerien-like viruses in swine, Italy. *Veterinary microbiology*, 149(1-2), 221-224.
15. Sato, G., Ido, H., Kiuchi, M., Kataoka, M., Katayama, K., & Tohya, Y. (2014). Characterization of St-Valerien-like virus genome detected in Japan. *The Journal of veterinary medical science*, 76(7), 1045-1050.
16. Marvin, S. A. (2016). The immune response to astrovirus infection. *Viruses*, 9(1), 1.
17. Nagai, M., Wang, Q., Oka, T., & Saif, L. J. (2020). Porcine sapoviruses: Pathogenesis, epidemiology, genetic diversity, and diagnosis. *Virus research*, 286, 198025.
18. Oka, T., Wang, Q., Katayama, K., & Saif, L. J. (2015). Comprehensive review of human sapoviruses. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 32-53.
19. Cavicchio, L., Tassoni, L., Laconi, A., Cunial, G., Gagliazzo, L., Milani, A., Campalto, M., Di Martino, G., Forzan, M., Monne, I., & Beato, M. S. (2020). Unrevealed genetic diversity of GII Norovirus in the swine population of North East Italy. *Scientific reports*, 10(1), 9217.
20. Parra, G. I., Squires, R. B., Karangwa, C. K., Johnson, J. A., Lepore, C. J., Sosnovtsev, S. V., & Green, K. Y. (2017). Static and evolving norovirus genotypes: implications for epidemiology and immunity. *PLoS pathogens*, 13(1), e1006136.
21. Desai, R., Hembree, C. D., Handel, A., Matthews, J. E., Dickey, B. W., McDonald, S., ... & Lopman, B. (2012). Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: a systematic literature review. *Clinical infectious diseases*, 55(2), 189-193.

Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló saját tudományos közlemények:

1. László, Z., Pankovics, P., Reuter, G., Cságola, A., Bodó, K., Gáspár, G., ... & Boros, Á. (2022). Development and Large-Scale Testing of a Novel One-Step Triplex RT-qPCR Assay for Simultaneous Detection of “Neurotropic” Porcine Sapeloviruses, Teschoviruses (Picornaviridae) and Type 3 Porcine Astroviruses (Astroviridae) in Various Samples including Nasal Swabs. *Viruses*, 14(3), 513. <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/3/513>

Viruses, IF: 4,7 [2022]

Folyóirat szakterülete: Scopus - Infectious Diseases SJR indikátor: Q1

Folyóirat szakterülete: Scopus - Virology SJR indikátor: Q2

2. László, Z., Pankovics, P., Urbán, P., Herczeg, R., Balka, G., Igriczi, B., ... & Boros, Á. (2025). Multiple Co-Infecting Caliciviruses in Oral Fluid and Enteric Samples of Swine Detected by a Novel RT-qPCR Assay and a 3' RACE-PCR-NGS Method. *Viruses*, 17(2), 193. <https://www.mdpi.com/1999-4915/17/2/193>

Viruses, IF: 3,8 [2024]

Folyóirat szakterülete: Scopus - Infectious Diseases SJR indikátor: Q1

Folyóirat szakterülete: Scopus - Virology SJR indikátor: Q2

Összesített Impakt Faktor érték: 8,5

Az értekezés alapjául szolgáló kongresszusi összefoglalók:

1. Introduction and large-scale evaluation of a novel one-step triplex RT-qPCR assay for simultaneous detection of pathogenic porcine sapeloviruses, teschoviruses (Picornaviridae) and type 3 porcine astroviruses (Astroviridae) in swine (tudományos poszter). 12th European Symposium of Porcine Health Management (ESPHM), Budapest, 2022. április 14.

2. Neuroinvasive porcine astrovirus infection associated with recurrent outbreaks of encephalitis, posterior weakness and paralysis among weaned piglets (tudományos poszter). 12th European Symposium of Porcine Health Management (ESPHM), Budapest, 2022. április 14.

További tudományos közlemények:

László, Z., Pankovics, P., Reuter, G., Cságola, A., Bálint, Á., Albert, M., Boros, Á.
Multiple Types of Novel Enteric Bopiviruses (Picornaviridae) with the Possibility of
Interspecies Transmission Identified from Cloven-Hoofed Domestic Livestock (Ovine,
Caprine and Bovine) in Hungary.

VIRUSES 13: 1 Paper: 66, 19 p. (2021)

Bodó, K., Boros, Á., László, Z., Nagyéri, G., Németh, P., Kille, P., Molnár, L. et al.
A novel beta-catenin homologue from the earthworm *Eisenia andrei*: Identification and
characterization during embryonic development, segment regeneration, and immune
response

INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES 306: 1
Paper: 141397, 15 p. (2025)

Bodó, K., Kellermayer, Z., László, Z., Boros, Á., Engelmann, P. et al.
Injury-Induced Innate Immune Response During Segment Regeneration of the
Earthworm, *Eisenia andrei*

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 22: 5 Paper: 2363, 22
p. (2021)

Reuter, G., Pankovics, P., László, Z., Gáspár, G., Hui, A., Delwart, E., Boros, Á.
Human-stool-associated tusavirus (Parvoviridae) in domestic goats and sheep
ARCHIVES OF VIROLOGY 167 5 pp. 1307-1310., 4 p. (2022)

Pankovics, P., Boros, Á., László, Z., Delwart, E., Reuter, G. et al.
Genome characterization, prevalence and tissue distribution of astrovirus, hepevirus and
norovirus among wild and laboratory rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*)
in Hungary

INFECTION GENETICS AND EVOLUTION 93 Paper: 104942, 14 p. (2021)

Bodó, K., Hayashi, Y., Gerencsér, G., László, Z., Kokhanyuk, B. et al.
Species-specific sensitivity of *Eisenia* earthworms towards noble metal nanoparticles: a
multiparametric in vitro study

ENVIRONMENTAL SCIENCE-NANO 7: 11 pp. 3509-3525., 17 p. (2020)

Boros, Á., László, Z., Pankovics, P., Fahsbender, E., Delwart, E., Reuter, G. et al.
High prevalence, genetic diversity and a potentially novel genotype of Sapelovirus A
(Picornaviridae) in enteric and respiratory samples in Hungarian swine farms

Boros, Á., Pankovics, P., László, Z., Tóth, F., Reuter, G. et al.

The genomic and epidemiological investigations of enteric viruses of domestic caprine (*Capra hircus*) revealed the presence of multiple novel viruses related to known strains of humans and ruminant livestock species

MICROBIOLOGY SPECTRUM 11: 6 Paper: e0253323, 28 p. (2023)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segített és támogatott a PhD munkám során. Első sorban témavezetőmnek, **Dr. Boros Ákosnak** szeretném megköszönni, hogy rengeteg energiát fordított mind szakmai, mind gyakorlati és személyi támogatásomra, mely végső soron lehetővé tette a PhD dolgozatom elkészülését.

Külön köszönettel tartozom **Prof. Dr. Reuter Gábornak**, aki az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetben végzett kutatásaimat mindvégig támogatta és szakmailag segítette. Hálás vagyok még **Dr. Pankovics Péternek**, **Dr. Tóth Fruzsínának** és az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet összes dolgozójának a több éven át tartó támogatásért. **Dr. Polgár Beátának** és **Dr. Szatmári Dávidnak** a rekombináns fehérjeexpresszióban és western blot kísérletekben nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom még **Dr. Cságola Attilának** a töretlen szakmai segítségért és az izgalmas sertés minták begyűjtésében nyújtott közreműködéséért, emellett köszönöm még **Dr. Balka Gyulának**, **Igriczi Barbarának** és **Dr. Albert Mihálynak** a különböző mintagyűjtemények rendelkezésünkre bocsátásáért, valamint köszönöm **Urbán Péternek** és **Herczeg Róbertnek** az új generációs szekvenáláshoz és bioinformatikiai adatfeldolgozáshoz kapcsolódó szakmai segítségéért.

Hálás vagyok a családomnak, akik nélkül el sem juthattam volna ideáig.